

⑬



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑪ Numéro de publication:

0 124 439
A2

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑰ Numéro de dépôt: 84400845.8

⑤① Int. Cl.³: **C 12 P 19/04, C 08 B 37/06**

⑱ Date de dépôt: 25.04.84

③① Priorité: 29.04.83 FR 8307208

⑦① Demandeur: **INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE**, La Géraudière, F-44072 Nantes Cedex (FR)

④③ Date de publication de la demande: 07.11.84
Bulletin 84/45

⑦② Inventeur: **Rombouts, Franciscus Maria** Inst. Nat. des Hautes, Etudes Agronomiques Dépt. des Scs Alimentaires, de Dreyen 12 Wageningen (NL)
Inventeur: **Thibault, Jean François** Lab. de Biochimie et Tech., des glucides Inra Nantes Rue de Géraudière, F-44072 Nantes (FR)
Inventeur: **Mercier, Christiane** Lab. de Biochimie et Tech., des glucides Inra Nantes rue de Géraudière, F-44072 Nantes Cedex (FR)

⑧④ Etats contractants désignés: **BE DE FR GB IT LU NL**

⑦④ Mandataire: **Phélip, Bruno** et al, c/o Cabinet Harlé & Phélip 21, rue de la Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR)

⑤④ Procédé de modification des pectines de betterave, produits obtenus et leurs applications.

⑤⑦ Procédé de modification des pectines de betterave par réaction oxydative enzymatique.

Les produits obtenus ont des masses moléculaires plus élevées et peuvent former des gels aqueux.

Application à titre d'agents épaississants ou gélifiants, notamment dans les industries alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

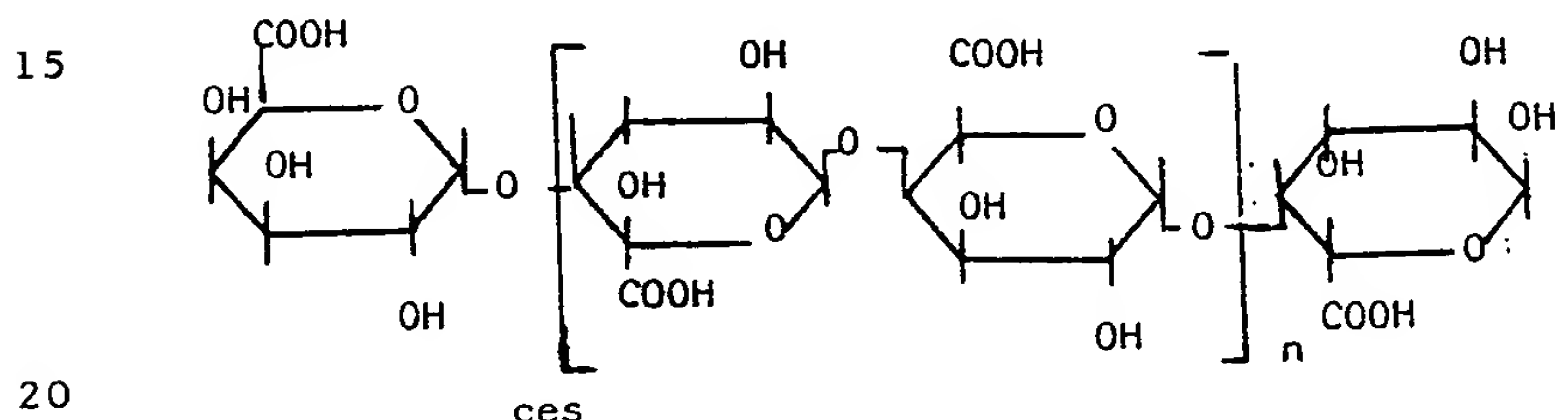
EP 0 124 439 A2

ACTORUM AG

"Procédé de modification des pectines de betterave,
produits obtenus et leurs applications"

L'invention concerne un procédé de modifica-
tion des pectines de betterave, les produits obte-
nus par ce procédé et leurs applications notamment
dans les industries alimentaires, cosmétiques ou
pharmaceutiques.

Les pectines sont des molécules naturelles
constituées d'acide polygalacturonique partielle-
ment méthylé, c'est-à-dire dans lesquelles les
fonctions acides sont partiellement estérifiées
par du méthanol ; le motif fondamental de ces
polymères répond à la formule :



Certaines de/pectines sont utilisées pour former
des gels aqueux ou pour épaissir différents milieux.
La possibilité et les conditions de formation de
ces gels dépendent essentiellement de la structure
de la pectine qui est elle-même fonction du végétal
dont elle est extraite et du procédé d'extraction.
Ainsi, on n'utilise actuellement que les pectines
extraites des pommes et des agrumes pour préparer
soit des gelées et confitures, soit des cosmétiques,
ou encore des adjuvants épaississants et déshydra-
tants de diverses compositions.

On sait que les pectines dites fortement
méthylées, c'est-à-dire celles dont plus de 50 %
des groupes carboxyliques des acides galacturoni-

ques sont estérifiées par le méthanol, gélifient en présence de saccharose et en milieu acide ; aussi elles sont particulièrement utilisées à la confection des gelées et des confitures.

5 Les pectines moins méthylées sont gélifiées en présence d'ions Ca^{2+} , grâce à la formation de liaisons de coordinence entre les atomes d'oxygène et le cation ; la préparation de gels convenables est toutefois délicate du fait de phénomènes secon-
10 daires de précipitation, notamment lors de l'addition de la solution de Ca^{2+} aux pectines.

Certaines pectines naturelles, vraisemblablement parce qu'elles portent des substituants sur la chaîne polygalacturonique, ne forment pas de
15 gels lorsqu'on leur applique les procédés connus de gélification c'est-à-dire soit une addition de saccharose en milieu acide, soit une addition de Ca^{2+} .

Ces informations sur la gélification des pectines figurent notamment dans l'ouvrage "Les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés". Bernard MONTIES et Claude COSTES -
20 Editions Gauthier-Villars (1980) pp. 232-251.

On sait que les pectines extraites des pulpes
25 de betterave ne forment pas de gels convenables par les procédés précédemment rappelés ; on pense que la présence de groupes acétyles, résultant de l'estérification de certains groupes hydroxyles, jouerait un rôle dans cette absence de gélifica-
30 tion ; comme ces polymères ont des masses moléculaires relativement faibles, ils ne peuvent être par ailleurs utilisés comme agents épaississants. C'est pourquoi aucune utilisation industrielle n'est connue actuellement, malgré l'abondance de cette

matière première : la pectine constitue 15 à 20 % de la matière sèche des marcs de betterave, comme elle constitue 15 à 20 % de celle des marcs de pomme.

5 Ainsi, le procédé selon l'invention, qui permet d'utiliser ces pectines après leur modification, présente un grand intérêt économique, puisqu'il permet la valorisation des résidus issus des betteraves, notamment sucrières.

10 L'invention concerne un procédé de traitement des pectines de betterave qui consiste à effectuer une réticulation oxydative enzymatique des pectines, ce qui conduit à des produits ayant des masses moléculaires plus élevées, qui seront
15 solubles dans l'eau ou donneront des gels avec l'eau. La réticulation est réalisée en faisant réagir un système oxydant, comprenant un agent oxydant, notamment le peroxyde d'hydrogène et une enzyme dont l'oxydant est un substrat, par exemple
20 dans le cas de H_2O_2 une peroxydase. L'invention concerne aussi les pectines modifiées obtenues par ce procédé de réticulation, les gels aqueux résultant de la mise en oeuvre de procédé, ainsi que les applications de ces pectines modifiées
25 et de ces gels comme agents épaississants et gélifiants, notamment dans les industries alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

 Le procédé de l'invention n'a jamais été utilisé pour traiter des pectines ; la Demanderesse a d'ailleurs constaté qu'il ne peut être appli-
30 qué avec succès qu'à certaines pectines et que celles issues des marcs de pomme, des agrumes, cerises, d'abricots ou des pommes de terre ne réticulent pas dans ces conditions ; il donne pourtant

de bons résultats avec les pectines tirées des betteraves, notamment sucrières, quelle que soit leur provenance.

Les pectines sont extraites des pulpes et
5 marcs de betterave selon des procédés connus en eux-mêmes et par exemple par traitement des pulpes par une solution aqueuse acide chaude pendant quelques heures ; ainsi, on peut mettre en contact pendant 1 à 2 heures les pulpes récupérées avec
10 une solution diluée d'acide sulfurique dont le pH est 1,5 à 2, à une température de 80°C. Lorsqu'un tel procédé d'extraction aboutit à des solutions de pectines de concentration convenable, on peut effectuer directement la réticulation dans ce
15 milieu après l'avoir mis à un pH convenant ; autrement, les pectines sont précipitées dans leur milieu d'extraction selon des méthodes connues en elles-mêmes, puis isolées par filtration et séchées pour donner des poudres, qui seront ensuite
20 traitées par le procédé selon l'invention.

Selon une mise en oeuvre préférée de l'invention, la réticulation enzymatique oxydative est réalisée par addition à la solution aqueuse de pectine de betterave de concentration choisie, de
25 0,3 à 0,6 mg de peroxydase par gramme de pectine et de 13 μ moles à 36 μ moles environ de peroxyde d'hydrogène en solution aqueuse par gramme de pectine. On effectue également la réticulation avec addition de 0,03 mg à 0,1 mg de peroxydase et 0,25
30 à 1,0 millimole de peroxyde d'hydrogène par gramme de pectine en solution ; dans ce cas, l'excès de peroxyde est détruit par addition d'une autre enzyme, la catalase. La masse moléculaire des pectines modifiées obtenues est fonction des con-

centrations et des proportions relatives des réactifs.

Les solutions diluées de peroxyde d'hydrogène étant peu stables, on prépare de préférence le réactif extemporanément à partir des solutions commerciales de H_2O_2 à 30 % ; les dilutions utilisées ont par exemple de 0,01 à 1 % de H_2O_2 dans H_2O (volume à volume).

La peroxydase peut être d'origine animale ou végétale, on utilise avantageusement la peroxydase radis noir type I, vendue par SIGMA (USA) ; elle peut être soit dissoute dans la solution aqueuse, soit immobilisée sur un support insoluble qui sera mis en contact avec le milieu réactionnel selon une manière connue en soi pour les réactions enzymatiques.

Le pH des solutions aqueuses de pectine peut être compris entre 4 et 7 environ ; il est évidemment choisi de façon telle que l'enzyme du système oxydant puisse fonctionner et que les pectines ne soient pas dégradées.

Selon la concentration de la solution aqueuse en pectine de betterave, la nature de la pectine et la quantité de système oxydant, il se forme à température ambiante, en quelques minutes, après l'addition du système oxydant, soit un gel, soit une solution de viscosité supérieure à celle de la solution de départ contenant la pectine réticulée.

Selon un autre aspect de l'invention, on déterminera préalablement à la réticulation, quelle est la concentration convenable de la solution de pectine de départ pour obtenir, soit une solution de viscosité accrue, soit directement

un gel. On a trouvé qu'en général avec des pectines de betterave ayant une masse moléculaire viscosimétrique de 40 000 à 50 000, un degré d'acétylation de 30 à 35 % et dont la teneur en résidus de sucres neutres est comprise entre 15 et 20 %, les solutions aqueuses dont la concentration en pectine est inférieure à 1,5 g/100 ml ne sont pas gélifiables et que, par contre, les solutions aqueuses de concentration supérieure à 2 g/100 ml donnent des gels épais, pour de faibles quantités de système oxydant ; avec un net excès de H_2O_2 et d'enzyme, on obtient des gels pour des concentrations en pectine aussi faibles que 0,3 g/100 ml. En général, les solutions de pectine de betterave ont une concentration maximale de 4 g/100 ml, étant donné leur solubilité aqueuse limitée.

Les nouvelles pectines modifiées selon l'invention peuvent être isolées des milieux aqueux où elles ont été préparées ; par exemple elles sont précipitées par addition d'un solvant à la phase aqueuse, tels que l'alcool ou l'acétone, ou par addition de sels minéraux (relargage) ; on isole ensuite les précipités par filtration ou centrifugation et on les sèche à pression ordinaire ou sous vide avec chauffage modéré, vers 40°C. On ajoute en général au moins un volume de solvant de précipitation par rapport au volume de la solution aqueuse et de préférence environ 4 volumes.

La possibilité d'isoler les pectines gélifiées sous forme de poudre sèche est un autre avantage de l'invention ; les gels de pectines de pomme ou agrume précédemment connus ne possédaient pas cette propriété. La poudre issue des gels selon l'invention, remise en présence de la quantité

convenable d'eau, redonne un gel.

Les poudres de pectines modifiées obtenues selon le procédé de l'invention peuvent être utilisées comme agents épaississants ou gélifiants; 5 elles sont très hydrophiles et sont capables de reprendre de grandes quantités d'eau.

En particulier, ces pectines modifiées sont utilisables pour préparer des produits alimentaires, tels que des desserts lactés, et par exemple des 10 flans préparables à température ambiante. Elles entreront aussi avantageusement dans la composition de desserts glacés ; on a en effet montré que les gels selon l'invention sont parfaitement stables si on leur fait subir des cycles de congélation/décongélation de -20°C à la température ambiante. 15

Une autre application avantageuse des pectines selon l'invention est la préparation de pommades, qui seront utilisées dans les domaines cosmétiques ou pharmaceutiques ; les pectines 20 jouant le rôle d'excipients.

Selon une autre mise en oeuvre de l'invention, on effectue la gélification de la solution aqueuse contenant les pectines de betterave en présence de divers principes actifs, ce qui aura pour résultat la formation de produits particulièrement 25 homogènes ou stabilisés. Ceci sera appliqué, par exemple, pour la microencapsulation d'arômes, de composés ayant une activité pharmacologique ou autre, ou encore pour la détoxification de certains milieux en emprisonnant, par exemple, des métaux 30 lourds.

Dans ce qui suit, on donnera des exemples de réalisation de l'invention.

EXEMPLE 1

Préparation d'une solution de pectines modifiées :

5 A 10 ml d'une solution aqueuse de pectine de betterave ayant un pH de 6 et contenant 0,3 mg de peroxydase de radis noir par gramme de pectine, on ajoute 1 ml d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène de telle façon que l'on ait 13 μ moles d' H_2O_2 par gramme de pectine. La réticulation est terminée après quelques minutes d'agitation à température ambiante.

10 Ce procédé a été appliqué à des solutions de différentes concentrations en pectines et la viscosité des solutions obtenues mesurées. Dans le tableau I figurent les résultats des essais exprimés en viscosités intrinsèques et en masses moléculaires, calculés selon la méthode décrite par H.S. OWENS, H. LOTZKAR, T.H. SCHULTZ et W.D. MACLAY dans J. Am. Chem. Soc. 68 1628-1632 (1946).

20

TABLEAU I

	Concentration en pectine (g/100 ml)	Viscosité intrin- sèque (cm ³ /g)	Masse moléculaire
25	témoin*	248	46 000
	0,6	435	70 000
	0,9	468	73 900
	1,5	461	73 000

30 * solution aqueuse de pectine, sans addition du système oxydant réticulant.

EXEMPLE 2

Gélification d'une solution aqueuse de pectines de betterave :

On introduit dans 1 ml d'une solution de

pectine de betterave (de concentration 3 g/100 ml),
à pH 6 environ, 0,1 ml d'une solution aqueuse de
peroxydase (de concentration 0,1 mg/ml) et 0,1 ml
d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène
5 de concentration 4,3 μ moles par ml ; on agite méca-
niquement pendant 1 à 2 minutes jusqu'à gélifica-
tion. Le gel est translucide et reste stable,
durant plusieurs mois à la température ambiante.

Dans le tableau II figurent les caractéristi-
10 ques rhéologiques d'un gel préparé selon ce procé-
dé et celles d'un gel de pectine amidée préparé
selon la méthode décrite par S.A. BLACK et C.J.B.
SMIT dans J. Food Science 37 726-29 (1972) à titre
de comparaison.

15 TABLEAU II

gel	Module "apparent" de rigidité g/cm	Force à la rupture (g)	Déformation (cm)
20 pectine amidée	15,2	11,80	0,45
selon ex. 2	11,6	36,3	0,67

Les mesures ont été effectuées avec un appareil
INSTRON (R).

25 Ces résultats montrent que le gel selon l'in-
vention est moins "cassant" que le gel préparé
selon une méthode connue.

EXEMPLE 3

Préparation d'une poudre de pectines modifiées:

30 Un gel de pectine de betterave est préparé
comme décrit dans l'exemple 2. On y ajoute 4
volumes d'éthanol aqueux (à 96 %) sous agitation;
la pectine modifiée qui précipite est isolée par
filtration, puis séchée à température ambiante.

Le pouvoir hydrophile de cette poudre a été déterminé en mettant de la poudre en présence d'un excès d'eau, dans un récipient gradué, et en mesurant le volume du gel reformé à l'équilibre.

5 On a obtenu 110 ml de gel avec 1 g de poudre de pectine de betterave préparée comme décrit ci-dessus.

EXEMPLE 4

10 En utilisant le même mode opératoire que celui décrit à l'exemple 2 et faisant varier les proportions relatives des réactifs, on obtient les résultats du tableau III.

TABLEAU III

15	concentration en pectine (g/l)	concentration en peroxydase (mg/l)	concentration en H_2O_2 (mmole/l)	gélification	augmentation de la masse moléculaire
	6,26	0,25	2	+	
20	5,01	0,25	2	+	
	3,76	0,25	2	-	
	2,51	0,25	2	-	
	5,45	0,67	2	-	
	5,61	0,1	2	-	140 %
25	3,48	1,7	8,3	+	
	3,5	2,0	2	+	
	3,01	8,3	4	-	150 %
	4,88	0,07	0,7	-	210 %
	3,19	0,04	1,3	-	180 %
30					

REVENDICATIONS

1. Procédé de modification des pectines de betterave, caractérisé en ce que l'on fait réagir sur les pectines un système oxydant comprenant
5 au moins un agent oxydant et une enzyme, ayant cet oxydant comme substrat.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'agent oxydant est le peroxyde d'hydrogène et l'enzyme une peroxydase.

10 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il consiste

1°) à ajouter à une solution aqueuse de pectine une quantité de peroxydase comprise entre 0,01 mg et 1 mg pour 1 g de pectine ;

15 2°) puis à ajouter une solution aqueuse d'eau oxygénée contenant de 10 μ mole à 1 mmole de H_2O_2 pour 1 g de pectine ;

3°) si nécessaire, à ajouter 0,1 mg environ de catalase pour détruire l'excès de H_2O_2 ;

20 4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel on isole la pectine modifiée à l'état de poudre, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à ajouter après la fin de l'oxydation un agent de relargage au milieu réactionnel, choisi
25 parmi les liquides comme un alcool, une cétone ou les sels minéraux neutres,

- à filtrer le précipité formé et à le sécher.

5. Pectine de betterave modifiée hydrosoluble préparée par le procédé selon l'une quelconque des
30 revendications 1 à 4, dans lequel la concentration de la solution de pectine de départ et les quantités de système oxydant sont trop faibles pour entraîner la gélification du milieu réactionnel.

6. Pectine modifiée selon la revendication

5, préparée par le procédé de l'une des revendications 3 ou 4 dans lequel la solution de pectine de départ est de concentration inférieure à 1,5 g/100 ml et que le système oxydant comporte
5 de 0,3 à 0,6 mg de peroxydase et de 13 à 36 μ moles de H_2O_2 pour 1 g de pectine.

7. Pectine de betterave modifiée ayant un pouvoir gélifiant en milieu aqueux préparée par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 dans lequel la concentration de la
10 solution de pectine de départ et les quantités d'agent oxydant sont suffisantes pour qu'il y ait gélification du milieu réactionnel.

8. Pectine modifiée selon la revendication 7, préparée par le procédé de l'une des revendications 3 ou 4 dans lequel la solution de pectine de départ est de concentration supérieure à 2 g/ml et que le système oxydant comporte de 0,3 à 0,6 mg de peroxydase et 13 à 36 μ moles de H_2O_2 pour
15 1 g de pectine.

9. Pectine modifiée selon la revendication 7, préparée par le procédé de l'une des revendications 3 ou 4, dans lequel la solution de pectine de départ est de concentration supérieure à
25 0,3 mg/100 ml et que le système oxydant comporte de 0,03 à 0,1 mg de peroxydase et de 0,25 à 0,1 mmole de H_2O_2 pour 1 g de pectine.

10. Gels aqueux caractérisés en ce qu'ils sont préparés par mise au contact de l'eau d'une pectine modifiée en poudre selon l'une des revendications 7 à 9.
30

11. Application d'une pectine modifiée selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, comme agents épaississants ou gélifiants de produits
35 alimentaires, de cosmétiques ou de produits pharmaceutiques.

